



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 ⁴ A61K 9/10		A1	(11) 国際公開番号 (43) 国際公開日	WO 89/06532 1989年7月27日(27.07.89)
(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00022 (22) 国際出願日 1989年1月11日 (11. 01. 89) (31) 優先権主張番号 特願昭63-5361 (32) 優先日 1988年1月13日 (13. 01. 88) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 大日本製薬株式会社 (DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒541 大阪府大阪市東区道修町3丁目25番地 Osaka, (JP)		(81) 指定国 AT(欧洲特許), BE(欧洲特許), CH(欧洲特許), DE(欧洲特許), FR(欧洲特許), GB(欧洲特許), IT(欧洲特許), JP, KR, LU(欧洲特許), NL(欧洲特許), SE(欧洲特許), US. 添付公開書類 國際調査報告書		
(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 安井清忠 (YASUI, Kiyotada) [JP/JP] 〒581 大阪府八尾市北本町2丁目14番24号 Osaka, (JP) 東 敏郎 (HIGASHI, Toshiro) [JP/JP] 〒655 兵庫県神戸市垂水区塙屋北町3丁目7番11号 Hyogo, (JP) 今里 雄 (IMASATO, Yuu) [JP/JP] 〒565 大阪府豊中市新千里東町2丁目5番A 3-202 Osaka, (JP) (74) 代理人 弁理士 小田島 平吉, 外 (ODAJIMA, Heikichi et al.) 〒107 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo, (JP)				

(54) Title: OOZING-PROOF LIPOSOME PREPARATION

(54) 発明の名称 漏出防止リポソーム製剤

(57) Abstract

A frozen or lyophilized liposome preparation containing a water-soluble high-molecular substance as the active ingredient, which contains gelatin, albumin or polyethylene glycol in the inner aqueous phase of liposome. This preparation does not cause oozing of the high-molecular substance upon freezing or lyophilization, thus being quite useful as a liposome preparation of such a substance.

(57) 要約

リポソームの内水相にゼラチン、アルブミン若しくはポリエチレングリコールを含むことを特徴とする水溶性高分子物質を有効成分とする凍結又は凍結乾燥リポソーム製剤。本発明の製剤は、凍結又は凍結乾燥による水溶性高分子物質の漏出が防止できるので、該物質のリポソーム製剤としてきわめて有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MR	モーリタニア
AU	オーストラリア	CA	カナダ	MW	マラウイ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NL	オランダ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	IT	イタリー	RO	ルーマニア
BJ	ベナン	JP	日本	SD	スーダン
BR	ブラジル	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CF	中央アフリカ共和国	KR	大韓民国	SN	セネガル
CG	コンゴー	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CH	スイス	LK	スリランカ	TD	チャード
CM	カメルーン	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
DE	西ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		
FI	フィンランド	ML	マリー		

漏出防止リポソーム製剤

技術分野

本発明は、凍結後又は凍結乾燥後の有効成分漏出を防止したりポソーム製剤に関し、更に詳細には、リポソームの内水相にゼラチン、アルブミン若しくはポリエチレングリコールを含むことを特徴とする水溶性高分子物質を有効成分とする凍結用又は凍結乾燥用リポソーム製剤（以下「本発明の製剤」という）に関する。

リポソームには水性物質により相互に一定の間隔を保たれた多数のリン脂質二重層からなる玉葱様多薄層構造を有するもの（以下「多重層リポソーム」という）と、水性物質を含む单一のリン脂質二重層を有するもの（以下「一枚層リポソーム」という）がある。

本明細書においては、多重層リポソームの一番外側にあるリン脂質二重層の外側又は一枚層リポソームのリン脂質二重層の外側を「外水相」と、多重層リポソーム中にある各リン脂質二重層間又は一枚層リポソームのリン脂質二重層の内側を「内水相」と呼ぶことにする。

リポソームは、水溶性物質なら何でも包含できること、マクロファージにより貪食作用を受けやすく肝臓、脾臓、

骨髓等の細網内皮系に取り込まれやすいうこと等から、生体内へ主薬を効率的に移行させる薬物療法の一手段として活発な研究が行われている。

リボソーム自身は冷蔵保存でも安定であるが、リボソームに包含された水溶性物質の中には冷蔵保存でも溶液中では不安定なものが多く、これらについては凍結又は凍結乾燥保存することが不可欠である。ところが、リボソームは凍結又は凍結乾燥により、内水相に包含させた水溶性物質が漏出することが知られており、この製剤の実用性を制限する一因となっている。

背景技術

従来、漏出を防止する手段としては、外水相にジメチルスルホキシド、グリセロール、アラニン、グリシンベタイン（J. Pharm. Pharmacol. 38, 259～263 (1986)）、多糖類、ポリビニルピロリドン、マンニトール（Int. J. Pharm. 22, 299～310 (1984)）、デキストラン、アラビアゴム、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、雄牛アルブミン、庶糖（特公昭61-21449）を用いている例及び内外両水相にトレハロース、マルトース、ラクトース、スクロース、グルコース、デキストラン等の糖を用いている例（特表昭62-500102）等が報告されているが、いずれも漏出防止の効果が不十分である。

発明の開示

本発明者等は、リボソームの内水相にゼラチン、アルブミン又はポリエチレングリコールを含有させることにより、凍結又は凍結乾燥による水溶性高分子物質の漏出を十分に防止できることを見出し、本発明を完成した。

本発明の製剤のリボソームに内包される有効成分である水溶性高分子物質としては、癌壊死因子(tumor necrosis factor; 以下「TNF」と略す)、インターロイキン1(以下「IL-1」と略す)、インターフェロン、インスリン、ウロキナーゼ、プロウロキナーゼ、ヘモグロビン、スーパーオキシドディスムターゼ、ソマトスタチン、ヘパリン等が挙げられる。

これは単独又は他の成分との組み合わせであってもよく、或いは公知の安定化剤を加えててもよい。

リボソームには前述のように、多重層リボソームと一枚層リボソームがあるが、本発明の製剤にはいずれのタイプのものも使用することができる。

膜強化剤としてコレステロール、荷電物質としてホスファチジン酸、ジセチルホスフェート、ステアリルアミン等を加えたものを用いてもよい。

本発明の製剤の製造概略の一例を以下に説明する。

親油性物質を有機溶媒に溶解し、窒素気流下又は真空下にロータリーエバボレーターで溶媒を除去し、脂質残渣を容器の壁上にフィルム化する。そこへ、有効成分である水溶

性高分子物質及びゼラチン、アルブミン又はポリエチレングリコールを溶解した水溶液を添加し、攪拌又は超音波処理によりリポソーム分散液を得る。これを孔径の減少するフィルターで順次濾過したりポリカーボネットのフィルターを用いて高圧で濾過したり、高圧乳化機（マントンゴーリン乳化機）を用いることにより粒子径を揃えてもよい。得られたりポソーム分散液を遠心分離、限外濾過、透析、ゲル濾過等に付し、リポソームに取り込まれなかった物質を分離除去し、凍結を行うか又はマンニトール、庶糖等の糖類やグリシン等のアミノ酸類を添加して凍結乾燥を行う。凍結の場合、外水相に公知の保護物質を加える方が好ましい。

以上のようにして製造した本発明の製剤は、凍結させたものは使用時に融解して、凍結乾燥させたものは使用時にそのまま又は適当な水性溶媒を加えることにより、注射剤、経口剤、外用剤等として用いることができる。

図面の簡単な説明

図1は凍結融解後のヒトTNF 包含率に対する、外水相に加えたトレハロース濃度の影響を示しており、図2は外水相に加えたゼラチン濃度の影響を示している。いずれも黒丸印が本発明のリポソーム製剤であり、白丸印が対照リポソーム製剤である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

①卵黄ホスファチジルコリン1gをクロロホルム10mlに溶解し、ロータリーエバボレーターでクロロホルムを除去した後、特開昭60-232097 実施例3で調製したヒトTNF(以下、単に「ヒトTNF」という)2,400万JRU及びゼラチン(分子量約10万)80mgを加えた50mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を加えガラスビーズを入れて攪拌し、脂質を分散させた後、0.8μm, 0.65μm, 0.45μm, 0.3μm, 0.22μmのメンブレンフィルターで逐次濾過し粒子径を整えた後、セファロース4Bのカラムを用いてゲル濾過(溶離液:50mMリン酸緩衝液pH7.0)し、外水相の薬物及びゼラチンを除去した。

②ゼラチンを加えないこと以外は①と同様にしてリボソーム懸濁液を調製した。

③上記①、②のリボソーム懸濁液にトレハロース又はゼラチンを図1及び図2に示した量加え-70℃の冷凍庫に1時間保存して凍結させ、室温で融解させた後、競合法による酵素免疫測定(以下「EIA」という)で外水相中のヒトTNF量を測定し、一方全ヒトTNF量はトリトンX100でリボソームを可溶化した後測定し、包含率を求めた。

結果を図1及び図2に示す。

図1、図2に示したようにヒトTNFとゼラチンが内水相に共存する本発明のリポソームは、ゼラチンを内水相に含まないリポソームよりも明らかにヒトTNFの包含率が高いことがわかる。また図1からわかるように、外水相へのト.レハロースの添加は更に包含率を改善する効果が認められた。

一方、図2に示したようにゼラチンの外水相への添加は、本発明のリポソームでは包含率を低下させ、ゼラチンを内水相に含まないリポソームにおいても、外水相ゼラチンの実用濃度(0~3mg/ml)では包含率を低下させており、従来知られているグリセロールや糖類等のリポソーム保護物質とは異なる性質を示した。

実施例1の2

実施例1①で作製したゼラチン内包リポソーム懸濁液を4℃で24時間保存した試料と40℃の恒温槽中で10分間保存して内水相のゼラチンをゲル化した試料を-70℃の冷凍庫に1時間保存して凍結させ、室温で融解させた後、競合法によるEIAによりヒトTNFの包含率を測定した。前者の包含率は67.9%であり、後者の包含率は69.0%であり、内水相のゼラチンがゾル化していてもゲル化していても同じ保護効果を示した。

実施例2

①卵黄ホスファチジルコリン 700mg, コレステロール 200mg, ステアリルアミン 100mg をそれぞれクロロホルムに溶解して混和し、溶媒を除去した後、ヒト TNF 2,400万 JRU 及びゼラチン (分子量約 7000) 80mg を添加して攪拌しメンブレンフィルターで濾過した後、表 1 又は表 2 に示した水溶液をリポソーム懸濁液に対して 1:1 の割合で加えて凍結融解又は凍結乾燥再溶解した。凍結乾燥は予備凍結 -50°C, 一次乾燥 -20°C, 二次乾燥 20°C 真空度 0.1 torr. 以下の条件で行った。再溶解は 50mM リン酸緩衝液, pH 7.0 を用いて行った。

②ゼラチンを加えないこと以外は①と同様にして対照リポソームを得た。

③上記①, ②のリポソームについて、競合法による EIA を用いてヒト TNF の包含率を測定した。表 1 及び表 2 に示したようにゼラチンを含まないリポソームに比べ、ゼラチンを内包するリポソームは、明らかに凍結融解及び凍結乾燥再溶解後のヒト TNF の包含率が高いことがわかった。

(以下余白)

表 1 凍結乾燥再溶解後のリポソームからのヒトTNF漏出に及ぼすゼラチンと各種糖の影響

リポソームの 外水相 への添加物	種類 0.8% ゼラチン を内包する リポソーム	対照 リポソーム
20% トレハロース	98.4	55.5
20% 庚糖	96.4	66.4
10% 乳糖	90.1	56.3

(以下余白)

9
表 2 凍結融解後のリポソームからのヒトTNF漏出に及ぼすゼラチンと各種糖の影響

リポソームの 外水相 への添加物	種類	0.8% ゼラチン を内包する リポソーム	対照 リポソーム
buffer		80.4	73.8
20% トレハロース		> 97.6	90.6
10% 乳糖		92.7	71.9
20% 庚糖		> 97.6	89.2
10% 果糖		96.4	82.2
10% ブドウ糖		97.5	83.8
10% マンニトール		> 97.6	87.3

(以 下 余 白)

実施例 3

①卵黄ホスファチジルコリン 900mg, ジパルミトイルホスファチジン酸ナトリウム 100mg をクロロホルム 10ml に溶解し、ロータリーエバボレーターでクロロホルムを除去した後、ヒト TNF 2,400 万 JRU 及びゼラチン（分子量約 7000）200mg を加えた 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えガラスビーズを入れて攪拌し、脂質を分散させた後、0.2 μm のポリカーボネートメンブレンフィルターで高圧濾過し、粒子径を整えた後、セファロース 4B のカラムを用いてゲル濾過（溶離液：50mM リン酸緩衝液 pH 7.0）し、外水相の薬物及びゼラチンを除去し、リボソーム懸濁液を調製した。このリボソーム懸濁液に 40% 庚糖水溶液をリボソーム懸濁液に対して 1:1 の割合で加え -70°C の冷凍庫に 1 時間保存後、室温で融解させた。

②ゼラチンを加えないこと以外は①と同様にして対照リボソームを得た。

③上記①、②のリボソームについて、競合法による EIA を用いて外水相中のヒト TNF 量を測定し、一方全ヒト TNF 量はトリトン X100 でリボソームを可溶化した後測定し、包含率を求めた。

表 3 に示したようにヒト TNF とゼラチンが内水相に共存するリボソームは、ゼラチンを内包しないリボソームよりも明らかにヒト TNF の包含率が高く、また外水相への庚糖

の添加は更に包含率を改善する効果が認められた。

表 3 凍結融解後におけるリポソームのヒトTNF 保持率

リポソームの 外水相 への添加物	種類 を内包する リポソーム	対照 リポソーム
buffer	69.5	13.2
40% 庚糖	96.0	69.9

実施例 4

ゼラチン200mg の代わりに牛血清アルブミン200mg を用いる他は、実施例3と同様にしてリポソーム製剤を調製し、包含率を求めた。

表4に示したようにヒトTNF とアルブミンが内水相に共存するリポソームは、アルブミンを内包しないリポソームよりも明らかにヒトTNF の包含率が高く、また外水相への庚糖の添加は更に包含率を改善する効果が認められた。

表 4 凍結融解後におけるリポソームのヒトTNF 保持率

リポソームの 外水相 への添加物	種類 2% アルブミン を内包する リポソーム	対照 リボリーム
buffer	71.9	13.2
40% 庚糖	97.7	69.9

実施例 5

ゼラチン200mg の代わりにポリエチレングリコール (分子量約 20,000) 200mg を用いる他は、実施例 3 と同様にしてリポソーム製剤を調製し、凍結融解を行った。また、実施例 2 と同様の条件によって凍結乾燥を行った。実施例 3 と同様にして包含率を求めた。表 5 及び表 6 に示したようにポリエチレングリコールを含まないリポソームに比べ、ポリエチレングリコールを内包するリポソームは、凍結融解及び凍結乾燥再溶解後のヒトTNF の包含率が明らかに高いことがわかった。

表 5 凍結融解後におけるリボソームのヒトTNF 保持率

リボソームの 外水相 への添加物	種類	2%ポリエチレングリ コール 内包 リボソーム	対照 リボリーム
buffer		62.7	13.2
40% 庚糖		92.6	69.9

表 6 凍結乾燥再溶解後におけるリボソームの
ヒトTNF 保持率

リボソームの 外水相 への添加物	種類	2%ポリエチレングリ コール 内包 リボソーム	対照 リボリーム
40% 庚糖		73.2	38.1

実施例 6

卵黄ホスファチジルコリン700mg,コレステロール200mg,ステアリルアミン100mgをそれぞれクロロホルムに溶解して混和し、溶媒を除去した後、特開昭61-27122実施例2で調製したヒトIL-1(以下、単に「ヒトIL-1」という)8.4mg及びゼラチン(分子量約7000)80mgを添加して攪拌しメンブレンフィルターで濾過した後、表7及び表8に示した糖を所定量加えて凍結融解又は凍結乾燥再溶解した。凍結乾燥は予備凍結-50°C,一次乾燥-20°C,二次乾燥20°C,真空度0.1torr.以下の条件で行った。再溶解は50mMリン酸緩衝液,pH7.0を用いて行った。ヒトIL-1の定量は競合法によるEIAにより行い、包含率は実施例1と同様にして求めた。

表7及び表8に示したように、ゼラチンを内包するリボソームは、凍結融解及び凍結乾燥再溶解後のヒトIL-1の包含率が95%以上であることがわかった。

(以下余白)

表 7 凍結融解後におけるリポソームのヒトIL-1保持率

リポソーム 外水相 への添加物	0.8% ゼラチン を内包する リポソーム
20% トレハロース	> 95.0
10% 乳糖	> 95.0
20% 庚糖	> 95.0

表 8 凍結乾燥再溶解後におけるリポソームのヒトIL-1
保持率

リポソーム 外水相 への添加物	0.8% ゼラチン を内包する リポソーム
20% トレハロース	> 95.0
10% 乳糖	> 95.0
20% 庚糖	> 95.0

実施例 7

①卵黄ホスファチジルコリン 700mg, コレステロール 200mg, デシルアミン 100mg をそれぞれクロロホルムに溶解して混和し、溶媒を除去した。ヒト TNF 2,400万 JRU を 5mM リン酸緩衝液含有 0.9% 食塩水 1ml に溶解した溶液（以下「TNF 単独」という） 10ml 及びゼラチン（分子量約 7000） 80mg をこれに添加して攪拌し、メンブレンフィルターで濾過した後、40% 庶糖水溶液をリポソーム懸濁液に対して 1:1 の割合で加え、予備凍結 -50°C, 一次乾燥 -20°C, 二次乾燥 20°C, 真空度 0.1 torr. 以下の条件で凍結乾燥を行った。50mM リン酸緩衝液, pH 7.0 を用いてこれを再溶解した。

②①のリポソーム製剤又はヒト TNF 単独を 300,000 JRU/匹となるように健康な ddY 系雄性マウスに静脈注射し、翌日の生存率を調べた。ヒト TNF 単独では、全数が死亡したのに対し、ヒト TNF リポソーム製剤では全数が生存していた。

実施例 8

BALB/c 系雌性マウス（8 週令）に Meth A sarcoma 細胞（ 2×10^5 ）を皮内移植した。7 日目に実施例 7 ①で作製したヒト TNF リポソーム製剤 3,000JRU/匹を腫瘍内に 1 回投与した後、移植 24 日目の治癒の程度を見たところ、全数のマウスが完治していた。尚、腫瘍重量が 1% 以下にな

ったものを完治と判断した。

実施例 7 及び 8 から、本発明のヒト TNF リボソーム製剤はヒト TNF 単独に比べて毒性の低減が見られ、しかも TNF 本来の治癒効果をも有していることがわかる。

産業上の利用可能性

本発明の製剤は、凍結又は凍結乾燥による水溶性高分子物質の漏出が防止できるので、該物質のリボソーム製剤としてきわめて有用である。

(以下余白)

請 求 の 範 囲

1. リポソームの内水相にゼラチン、アルブミン若しくはポリエチレングリコールを含むことを特徴とする水溶性高分子物質を有効成分とする凍結又は凍結乾燥リポソーム製剤。
2. 外水相に糖又はアミノ酸を含む特許請求の範囲第1項記載の凍結リポソーム製剤。
3. 水溶性高分子物質が蛋白である特許請求の範囲第1項記載のリポソーム製剤。
4. 蛋白がヒト癌壊死因子又はインターロイキン1である特許請求の範囲第1項記載のリポソーム製剤。

図1

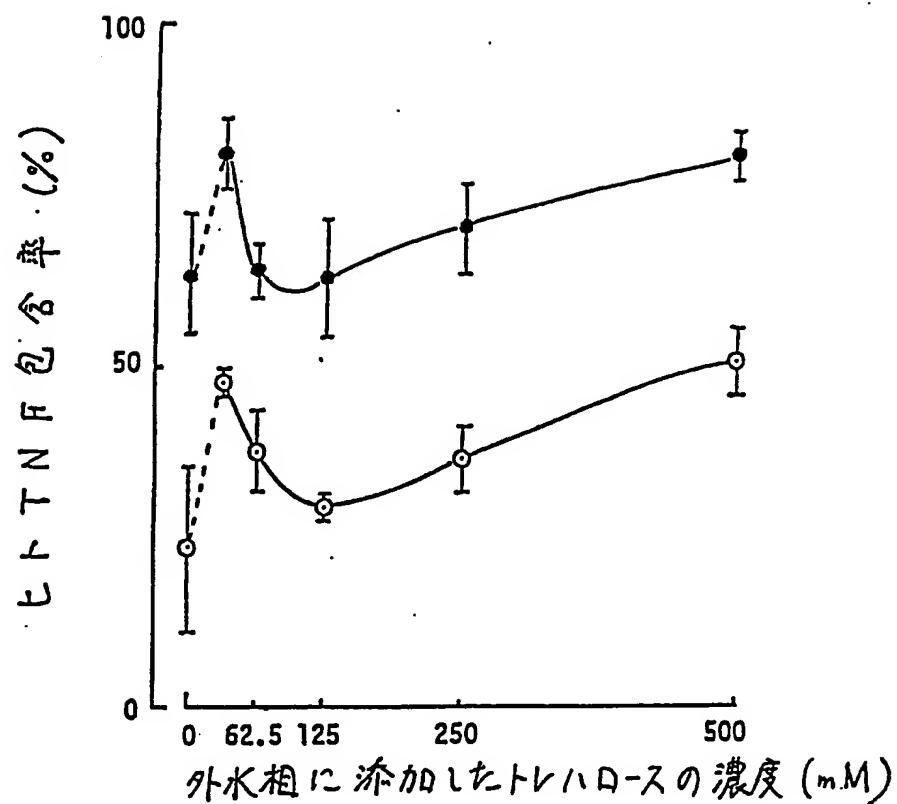
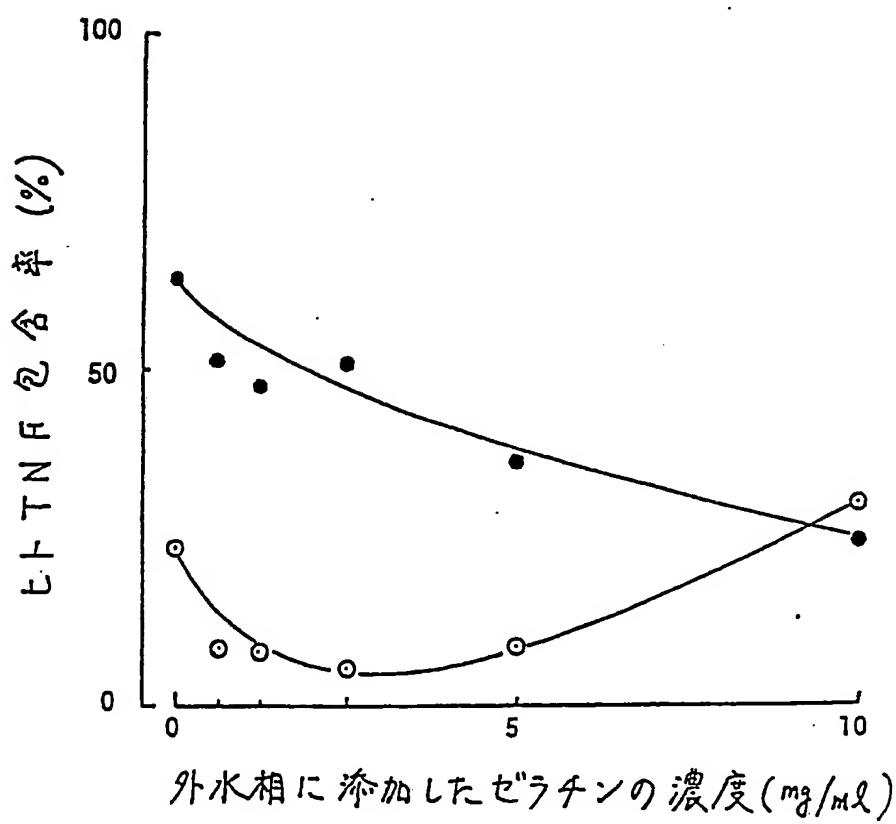


図2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP89/00022

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl⁴ A61K9/10

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
IPC	A61K9/10, A61K37/00-37/04

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹

Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	JP, B2, 61-21449 (Battelle Memorial Institute) 27 May 1986 (27. 05. 86) Claim 4 & DE, A, 2,834,308 & FR, A, 2,399,241 & US, A, 4,229,360	1-4
Y	JP, A, 58-174330 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) 13 October 1983 (13. 10. 83) Claim & EP, A, 91,258 & FR, A, 2,530,472 & DE, A, 3,373,628 & US, A, 4,447,355	1-4
Y	EP, A2, 251,001 (Biotest Wolfram G.m.b.H.) 07 January 1988 (07. 01. 88) Claim 1	1-4
E	JP, A, 64-9931 (Daiichi Seiyaku Co., Ltd.) 13 January 1989 (13. 01. 89) Pages 1 to 6 (Family: none)	1-4

* Special categories of cited documents: ¹⁰

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
March 24, 1989 (24. 03. 89)	April 10, 1989 (10. 04. 89)
International Searching Authority Japanese Patent Office	Signature of Authorized Officer

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 89/00022

I. 発明の属する分野の分類

国際特許分類 (IPC) Int. Cl.

A 61K 9/10

II. 国際調査を行った分野

調査を行った最小限資料

分類体系	分類記号
IPC	A 61K 9/10, A 61K 37/00-37/04

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

III. 関連する技術に関する文献

引用文献の ※ カテゴリ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	JP, B 2, 61-21449 (バテル・メモリアル・インス ティチュート) 27. 5月. 1986 (27. 05. 86) 特許請求の範囲第4項 & DE, A, 2,834,308 & FR, A, 2,399,241 & US, A, 4,229,360	1-4
Y	JP, A, 58-174330 (旭化成工業株式会社) 13. 10月. 1983 (13. 10. 83) 特許請求の範囲 & EP, A, 91,258 & FR, A, 2,530,472 & DE, A, 3,373,628 & US, A, 4,447,355	1-4
Y	EP, A2, 251001 (ビオテスト ファルマ ゲゼル シャフト ミット ベシュレンクター ハフツング) 07. 1月. 1988 (07. 01. 88) 特許請求の範囲第1項	1-4

※引用文献のカテゴリ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
 若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の
 日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出
 願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解
 のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新
 規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の
 文献との、当業者にとって自明である組合せによって進
 歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリーの文献

IV. 認 証

国際調査を完了した日 24. 03. 89	国際調査報告の発送日 10.04.89
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 河野直樹 ㊞

第2ページから続く情報

E	(Ⅲ 標の続き)	1-4
	JP, A, 64-9931 (第一製薬株式会社) 13. 1月. 1989 (13. 01. 89) 第1-6頁 (ファミリーなし)	

V. 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. 請求の範囲_____は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。
2. 請求の範囲_____は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。
3. 請求の範囲_____は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲_____
3. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲_____
4. 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。